

"مقاله پژوهشی"

اثر ازن‌دهی اولیه بر میزان تخم‌گذاری سیستم‌های آرتمیا (*Artemia* *fransiscana*)

فرهاد محمودی^۱، مهرداد فتح‌اللهی^{۱*}، فردین شالویی^۱، نعمت پیکران مانا^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۸

چکیده

به منظور بررسی اثر گاز ازن بر تخم‌گذاری سیستم‌های آرتمیا، در این آزمایش با به کارگیری تیمارهایی با میزان ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر ازن دمیده شده به ظروف محیط هیچ سیستم‌های گونه *Artemia franciscana* که به مدت ۱/۵، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب طول کشید، همزمان با یک گروه از سیستم‌های ازن دهی شده به صورت خشک به مدت ۱۵ دقیقه و گروه شاهد بدون ازن دهی تفریخ شدند. در نتایج به دست آمده تفاوت نهایی میزان تخم‌گذاری آرتمیاها در گروه‌های تیماری در مقایسه با گروه شاهد (بدون دمیدن ازن)، بعد از ۳۶ ساعت، معنی دار نبود. تحلیل نتایج در اولین آزمایش نشان داد که تیمارهای با دزهای کمتر از ۱۵ میلی گرم ازن در لیتر، موجب کاهش هیچ در ساعت‌های اولیه (در مدت ۲۴ ساعت) نسبت به شاهد ($p < 0.05$) شده‌اند. پس از این کاهش ابتدایی، میزان تفریخ این تیمارها تا ساعت ۳۶ جبران گردید و میزان شکوفایی سیستم‌های همه گروه‌های تیماری و شاهد یکسان شد ($p > 0.05$). با به کارگیری دزهای کمتر ازن دهی اولیه، با میزان ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر، تیمار ۲/۵ میلی گرم ازن در لیتر، توانست موجب افزایش معنی دار تخم‌گذاری با حدود ۹۳.۵٪ در مقایسه با شاهد (۸۵.۵٪) شود. با توجه به نتایج، ازن دهی با دز پایین، علاوه بر ضدعفونی سیستمها، نتایج تفریخ بهتری را برای سیستم‌های آرتمیا به دنبال می‌آورد.

کلمات کلیدی: سیستم، آرتمیا، شکوفایی، گاز ازن

مقدمه

غذاهای زنده در پرورش لارو آبزیان علاوه بر تامین نیازهای غذایی جانور، به دلیل تناسب این نوع غذا با رژیم غذایی طبیعی ماهی و عدم ایجاد آلودگی در محل پرورش، مورد ترجیح و اقبال زیادی از پرورش دهندگان قرار دارد (Camara, 2020; Sorgeloos et al., 1993). ارزش غذایی آرتمیا در مرحله ناپلئوس با حداکثر ۶۶ درصد پروتئین و ۱۴ درصد چربی و همچنین کلیه اسیدهای آمینه ضروری و اکثر اسیدهای چرب بسیار بالاست، از این رو آرتمیا عملاً از بهترین غذاهای زنده آبزیان به شمار می‌رود (آق، ۱۳۷۵؛ ۱۳۸۱؛ Agh and Obayes et al., 2020; Sorgeloos, 2005). آرتمیا یک جانور زیست مند کهن در آب شور است که با بروز ناملايمات محیطی و دریافت برخی از سیگنالهای محیطی کشنده و نیز تحریک ضروری ناشی از آن سیگنالها در فصول مورد نیاز، فازهای تشکیل پوشش جنینی در آن آغاز می‌شود (دادگر وحافظیه، ۱۳۹۳) و جانور در مرحله گاسترولا با حدود ۴۰۰۰ سلول در رشد و نمو دچار توقف می‌شود و به حالت سیست وارد می‌شود تا از جمعیت خود در مقابل خشکی و یا شوری نامطلوب رخ داده در زیستگاه، حفاظت نماید (Morris and Afzelius, 1970; Anderson et al., 1967). اولین و مهمترین عامل برای شروع دیاپوز، دریافت محرکهای محیطی لازم برای آن است، و پس از وقوع این تحریکات، دیگر شرایط مطلوب هم نمی‌تواند جنین را وادار به ادامه نمو کند و فرآیند دیاپوز شروع و به انجام خواهد رسید (Chen et al., 2009). بالاترین و مقاوم‌ترین حالت در زندگی جانوران در مقابل سختی‌های

محیطی، حالت سیست و مرحله دیاپوز است (Clegg and Trotman, 2002).

شکستن دیاپوز بعد از وقوع خواب جنینی روی می‌دهد و سیستمها پس از آن وارد مرحله نمو سریع می‌شوند و برای آغاز این امر باید شرایط محیطی بهینه فراهم گردد. هر جنین متوقف شده در مرحله گاسترولا یعنی سیست آرتمیا برای ادامه ی نمو و شروع فرآیند متابولیسم کامل نیاز به آبکشی اولیه و همزمان وجود کسژن محلول در آب دارد (Gajardo and Beardmore 2012; Dumitrascu, 2011).

طبق نظر محققین شکستن دیاپوز بیشتر یک فرآیند مکانیکی است تا یک فرایند فیزیولوژیک، زیرا در آزمایش‌ها و مشاهده‌های انجام‌شده زمان و تقویم رخداد دی-هیدراسیون به عنوان شرط ابتدایی شروع هچ، بر روی میزان هچ تاثیر ندارد؛ آب از دست دادن و آبگیری چند باره برای شکست دیاپوز گاهی ضروری می‌باشد؛ و اینکه تغییرات فیزیولوژیک شدیدی در این خصوص در سیستمها مشاهده نشده است (Abatzopoulos et al., 2002). بدیهی است برای این رخداد نیاز به وجود عوامل محیطی بسیار مهمی است که به محض شکستن دیاپوز، نمو سریع و رفتن به مرحله پس از دیاپوز در ظرف ۲۴ ساعت و تولید ناپلئوس و لارو در آرتمیا آغاز می‌شود (زاهدی و همکاران، ۱۳۹۵). به همین علت نحوه پوسه زدایی و روشهای هچ یا تفریح سیستمهای آرتمیا برای استحصال ناپلیوس آنها در تغذیه لاروها و پرورش آنها به وسیله محلولهای مختلف شیمیایی مورد تلاش محققین بوده است (فلاحکار و همکاران، ۱۳۹۰؛ پیرعلی خیرآبادی و منصور، ۱۳۹۵؛ موسوی ندوشن و فرحناک، ۱۳۹۵). در مراحل بعد از هچ، مقاومت مناسب و موفق در مقابل

کاربرد غیرکننده ازن و با غلظت محدود، برای شکستن پیوستگی و استحکام پوسته خارجی سلول‌های بذر به منظور افزایش جوانه زنی و شکستن خواب زیستی در بازه کاری تحریک بذرها در کشاورزی و مرتعداری، از کاربردهایی است که مورد توجه محققان قرار گرفته است (Penfield *et al.*, 2005).

از کاربرد غیر تهاجمی و درمانی ازن شامل خاصیت تحریک‌کنندگی رشد و نمو بیشتر در بازه‌ی درمانی و پزشکی گزارش شده است. Ekta و Elvis در سال ۲۰۱۱ در یک مرور کلی، اثرات درمانی ازن و استفاده در پزشکی با رعایت تنظیم دز دقیق آن را مرور کرده‌اند. استفاده از گاز ازن به شیوه غیرتنفسی، برای درمان‌های دندانپزشکی، کاهش کلسترول و انگیزش و تحریک به پاسخ‌های اکسیداتیو، اکسیژن‌سازی در ماهیچه‌های در حال استراحت و درمان هایپوکسی بافتها (بی‌اکسیژنی) به کار رفته است. براساس همین گزارش انگیزش (ایجاد تحریک) در متابولیسم اکسیژنی (Stimulation of oxygen metabolism) از سوی ازن برای افزایش گلبولهای قرمز خون، که منجر به افزایش میزان ۲ و ۳ دی فسفوجلایسرات در بافتها شده و در نتیجه افزایش اکسیژن‌رسانی به بافت صورت پذیرد، موثر بوده است. ازن چرخه کربس را فعال کرده و این ساز و کار با افزایش اکسیداتیو کربوکسیلاسیون پیرووات و تحریک تولید ATP صورت می‌گیرد. این روند همچنین باعث کاهش معنی‌دار NADH و کمک به روند اکسیداسیون در سیتوکروم C در سلولها می‌شود. به کارگرفتن ازن، تولید آنزیم‌های گلوتامین پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را که به‌عنوان اسکاونجر یا خورنده رادیکال‌های آزاد مضر و محافظان دیواره سلولی هستند، تحریک می‌کند.

مشکل شوری و تنظیم اسمزی با ایجاد یک همی لطف با ساختار و ترکیبی کاملاً پایین تر و کم غلظت تر از محیط فوق شور اطراف لاروهای به دنیا آمده با جذب آب و کاهش نمک‌ها از بدن به محیطی با گرادیان بالاتر صورت می‌گیرد که سیستمهای پمپ سدیم و پتاسیمی نقشی بسزا در این فرآیند دارند (Clegg and Trotman, 2002). همچنین با توجه به پایین آمدن میزان اکسیژن محلول در آبهای شور نیز این مشکل با بالا رفتن کارایی ناپلئوس و لاروها در تبادل اکسیژن از محیط و نیز در بدن به خوبی صورت می‌گیرد (Clegg and Trotman, 2002; Conte, 1984; Dwivedi *et al.*, 1987).

گاز ازن با نسبت طبیعی ۰/۰۱ تا ۰/۰۴ قسمت در میلیون در هوای آزاد دارای خاصیت اکسید‌کنندگی قوی و نیز ضدعفونی‌کنندگی است که قدرت طبیعی غیرفعال سازی مواد فعال اکسید‌کننده و ارگانسیم‌ها را در محیط دارد (Wen, 2001; Bruce *et al.*, 2020). مدت ماندگاری گاز ازن در آب نیز ۱۰ تا ۱۵ دقیقه است.

پرورش‌دهندگان با وجود کاربرد موثر ازن برای ضد عفونی کردن آب اذعان می‌دارند که ازن یک کشنده به تمام معنا است و با کاربرد آن در صورتی که کاملاً از آب خارج نشود، تلفات بالایی میان لاروهای ماهیان رخ می‌دهد. پژوهش در خصوص تاثیرات متفاوت کشنده و یا غیرکشنده ازن، نشان داده است که در هنگام در معرض قرارگرفتن باکتری‌ها به ازن با غلظت پایین، این تماس باعث می‌شود تا همه باکتری‌ها به‌طور کامل از بین نروند و ازن تنها با از بین بردن دیواره باکتری‌ها، با دز مناسب به عاملی کشنده برای آنها تبدیل می‌گردد (Thanomsab *et al.*, 2002).

تحریک تولید بیشتر پروستاسیکلین (نوعی پروستوگلانندین)، که یک واسودیلاتور (کاهنده فشار خون) است، نیز توسط مولکولهای ازن تاثیر می پذیرد (Komanapalli and Lau, 1996).

این مجموعه از فرآوردها نشان از خاصیت تحریک کنندگی ازن برای افزایش فعالیت های زیستی درون و برون سلولی در انسان دارد که شاید تاکنون از دید محققان حوزه آبرزیان دور مانده است. در خصوص استفاده از ازن برای بررسی تاثیر آن در شکوفایی و هیچ سیستم آرتیمیا گزارش و منابع ویژه ای یافت نشده است که شاید این امر مربوط به فرض اولیه خطر و اثر کشنده ازن بر لاروهای آبرزیان بوده و هدف استفاده شیلاتی ازن تنها برای ایجاد کشندگی بر میکروارگانیسم ها و بازدارندگی از بروز بیماری ها بوده است. در این تحقیق با فرض اینکه یک دوز بی خطر ازن در محیط زیست سیستم های آرتیمیا، موجب تحریک سیستم های در حال هیچ شده و یا اینکه شکافتی ایمن در غشای جنین را فراهم می نماید، تاثیر احتمالی آن در میزان هیچ سیستم های آرتیمیا بررسی شده است.

مواد و روش ها

در آزمایش اول در یک تیمار، سیستم های آرتیمیا به صورت خشک در مقابل ازن دمیده شده قرار گرفتند. سیستم های خشک آرتیمیا فرانسیسکانا، ایران آرتیمیا، ایران، تهران. نرخ هیچ ۸۵٪، ۲۰۰۰ لوکس) به مدت ۱۵ دقیقه ازن دهی شدند (با یک ازن ساز با دبی ۲۰۰ میلی گرم در ساعت ازن دهی) و سپس این سیستم ها با روش معمول بعد از آبکشی ۹۰ دقیقه ای، در انکوباسیون همراه با تیمارهای دیگر (یعنی تیمارهایی که در انتهای آبکشی اولیه مورد دمیدن ازن قرار گرفتند) تفریخ شدند

تا با قرار دادن نتایج درصد تفریخ تیمارها در کنار شاهد (بدون ازن دهی)، نشانه های صدمه یا عدم صدمه به سیستم های آرتیمیا (و آثار میکروسکوپی احتمالی بر پوسته و بافت) مشخص شود. برای تیمارهای دیگر در آزمایش اول، سیستم ها به مدت ۹۰ دقیقه آبکشی (هیدراته) شدند. بعد از آبگیری اولیه در آزمایش اول با به کارگیری تیمارهای پنجگانه میزان ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر ازن در محیط سیستم های آبکشی شده، با مدت ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۱۱ و ۱۵ دقیقه دمیدن ازن (به ترتیب) اعمال شد، میزان و درصد تخم گشایی سیستم های آرتیمیای تیمارها با گروه شاهد (بدون ازن دهی) مقایسه شد. آزمایش اول در یک طرح آزمایش کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و سه تکرار ازن دهی شده در پایان آبکشی اولیه و یک شاهد بدون ازن دهی و یک گروه شاهد منفی (ازن دهی سیستم خشک به مدت گفته شده) در آزمایشگاه اکولوژی آبرزیان دانشگاه شهرکرد انجام پذیرفت. هدف از به کارگیری تیمارها در کل آزمایش، مشاهده میزان هیچ در تیمارها نسبت به شاهد و مشاهده تلفات یا عدم تلفات در اثر ازن دهی، و سرانجام رسیدن به بهترین دز پیشنهادی برای به کارگیری جهت رسیدن به بیشترین شکوفایی در سیستم ها (ناشی از فرض اثر مطلوب غیرکشنده ازن بر سیستم ها هیچ) بوده است. پس از گذشت ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۴ و ۳۶ ساعت از شروع انکوباسیون، از هر تکرار در هر تیمار، سه میلی لیتر برداشت نمونه جهت شمارش و تعیین میزان هیچ صورت گرفت (با ۳ تکرار در قرائت). تعداد سیستم های تفریخ نشده، سیستم ها در حالت چتری و همچنین ناپلیوس های به دنیا آمده در این نمونه ها شمارش شدند و درصد تفریخ هر تیمار محاسبه و برآورد شد. نمونه های تیمار سیستم های خشک در

معرض ازن در هوا به مدت ۱۵ دقیقه، به صورت جداگانه از نظر شکستگی و آسیب بافتی احتمالی بعد از تثبیت در فرمالین و برای مشاهده و ثبت تصویر، نگهداری شدند تا در صورت مشاهده پدیده‌های رخ داده احتمالی، نوع آسیبهای غیر معمول گزارش شوند. با مشخص شدن نتایج اولین آزمایش، آزمایش دوم برای مشاهده اثر زیستی ازن محدودتر و کم دز در انکوباسیون سیستم‌های آرتیمیا، و با توانایی احتمالی ازن در تحریک و افزایش فعالیت زیستی جنین داخل سیستم در فرآیند هچ انجام شد. با توجه به نتیجه مشاهده شده در آزمایش نخست و مشاهده تاخیر در روند هچ ناشی از دزهای پایین‌تر (کاهش میزان نمو و رشد جنین)، سه تیمار با غلظت پایین از ازن در زمان های ۳، ۱/۵ دقیقه و ۴۵ ثانیه دمیدن یعنی حل شدن ۱۰، ۵۰ و ۲/۵ میلی گرم ازن در آب به ترتیب در شروع هچ به عنوان تیمارهای مناسب برای بیشترین تحریک کنندگی و افزایش هچ احتمالی در آزمایش دوم برآورد و در نظر گرفته شدند. پس از اعمال این دزهای ازن به آب انکوباتورها بعد از آبکشی سیستمها (نیم ساعت آبکشی اولیه)، و مشابه شرایط آزمایش اول درصد تفریخ سیستمها در زمان ۸ و ۲۴ ساعت (زمان مورد علاقه پرورش دهندگان ماهیان زینتی) از انکوباسیون آزمایشی محاسبه شد.

سیستم انکوباسیون و برآورد تخم‌گذاری سیستم‌ها

یک آکواریوم شیشه‌ای با حجم ۱۳۰ لیتر جهت استقرار ۲۵ انکوباتور ۱/۵ لیتری در کنار هم در نظر گرفته شد (حجم آب محیط کشت ۱ لیتر در نظر گرفته شد). جهت هم‌دما کردن آب اولیه انکوباتورها و

رساندن دمای آن‌ها به ۲۷ درجه سانتی‌گراد از بخاری ترموستات‌دار استفاده شد و در اتاق آزمایشگاه حرارت مناسب از بخاری گازسوز معمولی نیز تامین می‌شد. برای تخم‌گذاری سیستم‌ها در انکوباتورها از سنگ نمک (بدون ید) استفاده و داخل هر انکوباتور ۱ لیتر آب شور ۲۵ ppt با ۸/۵-۹ pH ریخته شد. تنظیم pH با اضافه کردن سودسوزآور ۴۰ درصد انجام گرفت (عملاً این افزودن با قطره چکان صورت پذیرفت) و لوله‌های هوادهی برای هر انکوباتور به صورت جداگانه تعبیه گردیدند. لوله‌های هواده در هر انکوباتور به صورتی قرار گرفتند که سنگ هوا در کف انکوباتورها قرار گیرد تا هوادهی به صورت کامل از کف انجام و گردش کامل سیستمها در درون انکوباتورها صورت پذیرد. کلیه انکوباتورها تحت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند و از ورود سایر نورهای محیطی به محل آزمایش ممانعت به عمل آمد (پیرعلی خیرآبادی و منصورى، ۱۳۹۵؛ Agh and Sorgeloos, 2005). انجام هوادهی برای شروع هچ بلافاصله بعد از دمیدن ازن های تیمار با در نظر گرفتن مدت آن شروع شد.

از هر انکوبانور ۳ نمونه ۳ میلی‌لیتری برداشت و برای تثبیت و شمارش آن‌ها از فرمالین ۴ درصد استفاده شد. جهت تعیین درصد تخم‌گذاری، تعداد ناپلیوس (N)، تعداد سیستم‌هایی که در مرحله چتری قرار داشتند (U) و تعداد سیستم‌های تخم‌گذاری نشده (E) به صورت جداگانه در لام بوگارف مورد شمارش قرار گرفتند. برای ارزیابی درصد هچ (%H) برای هر تیمار، از فرمول $\%H = [(N+U)/(N+U+E)] \times 100$ استفاده شد (پیرعلی خیرآبادی و منصورى، ۱۳۹۵؛ موسوی ندوشن و فرحناک، ۱۳۹۵).

تجزیه و تحلیل های آماری

برای تحلیل نتایج مربوط به تاثیر معنی دار تیمارهای آزمایش و نیز تغییرات در میانگین تفریخ سیستمها از نرم افزار SPSS ver. 20 و آزمون ANOVA و از نرم افزار اکسل ۲۰۱۹ برای رسم و تحلیل نمودارهای نتایج آزمایش استفاده شد.

نتایج

نتایج مقایسه میزان هیچ سیستمهایی که در انکوباسیون، بعد از زمان هیدراتاسیون به میزان ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر ازن به عنوان تیمارهای آزمایش دریافت کرده بودند با دو گروه دیگر شامل گروه شاهد (آب ازن دهی نشده) و گروهی که سیستم ها به مدت ۱۵ دقیقه به صورت خشک ازن دهی شدند (شاهد منفی)، به صورت درصد هیچ در جدول ۱ ارائه شده است.

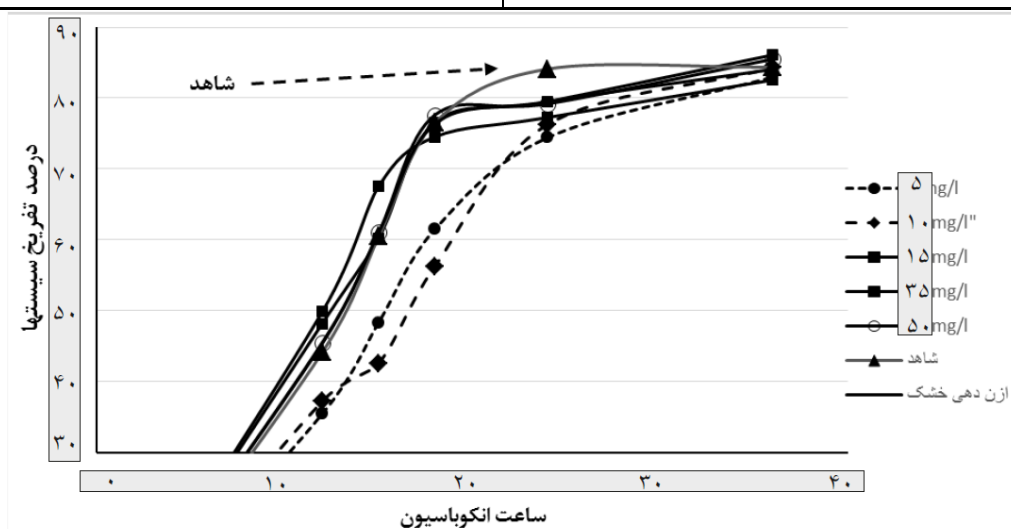
انجام آزمون آماری هیچ گونه اختلاف معنی داری بین گروه های آزمایشی و شاهد از نظر درصد تفریخ سیستمها را بعد از ۳۶ ساعت دوره کامل انکوباسیون نشان نداد ($p > 0.05$). میزان هیچ تضمین شده کارخانه برای بسته بندی آرمیا ۸۵ درصد بود که با توجه به میزان میانگین گروه های تیماری، همه ی تیمارها به میزانی از هیچ رسیدند که با هیچ تضمینی کارخانه نیز تفاوت معنی داری نداشته اند ($p > 0.05$). با توجه به نتایج جدول ۱، در همه تیمارهای آزمایشی بعد از ۳۶ ساعت اتمام دوره انکوباسیون، میزان تفریخ سیستمها با شاهد برابر و از سویی درصد تفریخ سیستمها در گروه

ها و شاهد از ۸۵ درصد (تضمین استاندارد کارخانه) نیز بالاتر نرفته است.

در قبل از اتمام دوره انکوباسیون یعنی در مدت ۲۴ ساعت از ۳۶ ساعت کل زمان انکوباسیون میزان هیچ شاهد به حدود ۸۴ درصد رسید و در همین مدت از فرآیند انکوباسیون، میزان هیچ سیستمها در سه گروه تیماری ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر ازن دهی نسبت به شاهد به طور معنی داری کمتر بوده اند ($p < 0.05$). در تیمارهای آزمایشی با دزهای کمتر از ۱۵ میلی گرم به این ترتیب ازن دهی باعث کاهش اولیه (در مدت ۲۴ ساعت از ۳۶ ساعت فرایند انکوباسیون) سرعت تفریخ در سیستمها شد، ولی میزان تفریخ در زمان نهایی و اتمام دوره انکوباسیون یعنی ۳۶ ساعت در هیچ گروهی نسبت به هم، نسبت به شاهد و تضمین کارخانه کاهش نداشته است. نتایج جدول یک در ساعتهای ۱۲، ۱۸ و ۲۴ انکوباسیون و مشاهده روند میزان هیچ در نمودار شکل ۱ در تیمارهایی که میزان ازن دهی به آب نسبت به سایر تیمارها کمتر بوده است (سه تیمار ۱۵، ۱۰ و ۵ میلی گرم ازن در لیتر به ترتیب با مدت ۴/۵، ۳ و ۱/۵ دقیقه ازن دهی)، کاملاً بازگوگر روند تفریخ کمتر سیستمها بوده و تاثیر ازن دهی قابل مشاهده است. سیستمهایی که به صورت خشک تحت تأثیر ازن قرار داده شدند نیز از نظر میزان تفریخ با تیمار شاهد تفاوتی نداشتند، و فرض کشته شدن سیستمها در مقابل دمیدن ازن با توجه به میزان هیچ در همه ی تیمارها و نیز شاهد منتفی است.

جدول ۱: میانگین درصد تفریخ ($\pm SE$) در تیمارهای آزمایشی (میزان ازن به کار گرفته شده) در زمان های مختلف انکوباسیون

تیمار (mg/lit)	زمان تفریخ (ساعت)	میانگین (%)	$\pm SE$	تیمار (mg/lit)	زمان تفریخ (ساعت)	میانگین (%)	$\pm SE$
شاهد (۰)	۱۲	۴۴/۱	۰/۹۸	۱۵	۱۲	۴۹/۸	۵/۵۰
	۱۵	۶۰/۴	۲/۲۷		۱۵	۶۷/۵	۳/۳۰
	۱۸	۷۶/۵	۰/۶۹		۱۸	۷۴/۵	۱/۹۰
	۲۴	۸۴/۱	۰/۳۶		۲۴	۷۷/۳	۱/۵۰
	۳۶	۸۴/۴	۰/۸۷		۳۶	۸۲/۶	۱/۴۰
سیست خشک ازن دهی شده ۵۰	۱۲	۴۵/۴	۵/۶۰	۳۵	۱۲	۴۸/۲	۱/۵۰
	۱۵	۶۱	۳/۱۰		۱۵	۶۰/۲	۲/۱۰
	۱۸	۷۶/۴	۱/۷۰		۱۸	۷۶/۶	۰/۹۵
	۲۴	۷۹/۵	۰/۹۰		۲۴	۷۹/۵	۱/۳۰
	۳۶	۸۴/۱	۱/۱۰		۳۶	۸۶/۱	۱/۲۰
۵	۱۲	۳۵/۵	۰/۰۳	۵۰	۱۲	۴۵/۵	۱/۸۰
	۱۵	۸۴/۳	۱/۰۱		۱۵	۶۱/۰	۰/۶۳
	۱۸	۶۱/۵	۰/۷۵		۱۸	۷۷/۶	۱/۲۰
	۲۴	۷۴/۴	۰/۹۰		۲۴	۷۹/۲	۱/۳۰
	۳۶	۸۲/۹	۰/۷		۳۶	۸۵/۵	۰/۶
۱۰	۱۲	۳۷/۲	۱/۱۰	تضمین کارخانه %	۱۲	۴۵/۵	۱/۸۰
	۱۵	۴۲/۶	۱/۱۰		۱۵	۶۱/۰	۰/۶۳
	۱۸	۵۶/۳	۱/۶۰		۱۸	۷۷/۶	۱/۲۰
	۲۴	۷۶/۳	۰/۷۰		۲۴	۷۹/۲	۱/۳۰
	۳۶	۴۸/۳	۱/۹۰		۳۶	۸۵/۵	۰/۶



شکل ۱: میزان و روند تفریخ سیستم ها از شروع آزمایش تا پایان تفریخ (انکوباسیون ۳۶ ساعته) در تیمارهای مختلف ازن دهی بر حسب میلی گرم ازن در ساعت (درصد هچ بر ساعت)

۲/۵ میلی گرم در لیتر نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بوده است ($p < 0/05$). (جدول ۲).

بحث

توانایی یک موجود برای ایجاد یک حالت زیستی نهفته (cryptobiotic) در طول زندگی، ساز و کاری مهم برای زنده ماندن در بین جمعیت‌های ساکن بیوتیپ‌ها با شرایط نامساعد محیطی است که بقای افراد جمعیت را تضمین می‌کند (Saygi, 2003). آرتیمیا به‌عنوان نماینده چنین گروهی از آبزیان در طول دوره‌های قبل از خشک شدن یا دمای شدید و شوری آب زیستگاه، از طریق ایجاد دیپوز در وضعیت جنینی، بقای خود را سالها در مقابل نابودی تضمین می‌کند و منشأ جمعیتی جدیدی در مکان و زمانی می‌شود که پارامترهای زیستی و غیرزیستی زیستگاه دوباره مطلوب می‌گردد (Saekil Yun et al., 2020; Hazael et al., 2019; Lavens et al., 1986). بعد از شکسته شدن خواب سیستمها و به دنیا آمدن ناپلی‌ها در زیستگاه، فرآیندهای ویژه سازگاری و تنظیم اسمزی برای زیستن آغاز می‌گردد (Croghan, 1958 a,b).

در این مطالعه تلاش شد که اثر ازن دهی اولیه بعد از آبکشی اولیه، بر روی تفریخ سیستم‌های آرتیمیا بررسی گردد. نتایج مطالعه نشان داد میزان هیچ سیستم‌های در معرض ازن دهی اولیه، حتی در دوزهایی بالا از غلظت ازن که در اثر دمیدن با توان ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر حاصل از ۱۰ و ۱۵ دقیقه دمیدن در محیط ایجاد شد، با شاهد تفاوتی معنی‌دار نداشته‌اند و به‌طور کلی آب ازن‌دهی شده باعث کاهش درصد تفریخ سیستم‌ها و همچنین بروز مرگ و میر ناشی از مرگ جنین در داخل سیستم‌ها نشده است. دمیدن ازن

در نتایج آزمایش دوم که با اعمال دوزهای کمتر از ۱۵ میلی گرم در لیتر که در کاهش ابتدایی تفریخ در آزمایش نخست نقش داشتند، انجام شد، در مدت ۸ و ۲۴ ساعت انکوباسیون (زمان مورد علاقه پرورش دهندگان ماهیان زینتی)، نتایج این سه تیمار از دمیدن ازن ملایم در شروع هیچ، در مدت ۳، ۱/۵ دقیقه و ۴۵ ثانیه یعنی حل شدن ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم ازن در آب در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: میانگین درصد تفریخ ($\pm$ SE) سیستم‌های آرتیمیا با تیمارهای آزمایشی با دز پایین ازن در زمان‌های ۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون

زمان تفریخ (ساعت)	تیمار mg.l ⁻¹	میانگین (%)	خطای معیار (SE)
۸	شاهد	۴۱/۵ ^{ns}	۱/۸
	۲/۵	۳۹/۵ ^{ns}	۲/۲
	۵	۳۷/۴ ^{ns}	۱/۴
	۱۰	۴۲/۷ ^{ns}	۲/۱
۲۴	شاهد	۸۰/۹ ^a	۱/۱
	۲/۵	۹۳/۷ ^b	۰/۹
	۵	۸۵/۳ ^a	۱/۷
	۱۰	۸۰/۷ ^a	۱/۱

حروف انگلیسی نشان دهنده معنی داری تفاوت بین میانگین تیمارها می‌باشد

بر اساس داده‌های این جدول میزان تفریخ سیستم‌ها در زمان ۲۴ ساعت، تیماری که آب سیستم‌های هیدراته شده در آن با ۲/۵ میلی گرم در لیتر به مدت ۴۵ ثانیه ازن‌دهی شده بود، میزان تفریخ به بالاتر از استاندارد کارخانه (۸۵٪) یعنی $93/7 \pm 0/9$ ٪ رسیده است. نتایج حاصل از بررسی مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و نیز نتایج آزمون دانکن حاکی از آن است که کارایی میزان هیچ در تیمار ازن‌دهی شده به میزان

به سیستمها در محیط بدون آب و خشک با میزان ۵۰ میلی گرم ازن (به مدت ۱۵ دقیقه) نیز تاثیر منفی بر زنده ماندن آنها در هیچ نسبت به شاهد نداشته و خطر از بین رفتن سیستمها با ازن تا حدود زیادی منتفی است. به نظر می‌رسد پوسته ی این سیستمها در مقابل ازن با غلظت زیاد، همچون ناملايمات ديگر محیط زیست مانند خشکی، شوری و اشعه ماوراء بنفش مقاوم می‌باشند (Mat Taib et al., 2020). اگرچه مطالعه‌ای در زمینه تفریخ سیستم آرتمیا با استفاده از ازن در منابع مشاهده نشد، مطالعات مشابه در زمینه استفاده از ازن برای تفریخ تخم ماهی‌ها نشان می‌دهد در تحقیقات انجام شده، در بسیاری از موارد، افزایش مرگ‌ومیر در تفریخ آبزیان، ناشی از مرگ جنین‌های تخم‌گذاری نشده یعنی تاثیر ازن بر پوسته تخم، روی داده است. در مطالعه‌ای که روی تخم‌های ماهی هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus*) انجام شده است بالاترین میزان مرگ‌ومیر در تخم‌هایی مشاهده شده است که با تنها ۴ میلی گرم در لیتر ازن به مدت ۱ دقیقه تحت تاثیر قرار گرفته بودند (Grotmol and Totland, 2000). مطالعات نشان داده است که اثرات منفی قرار گرفتن در معرض ازن بر تخم‌گذاری ممکن است ناشی از ایجاد تغییر پلیمر پروتئینی پوسته به وسیله عملکرد اکسیدان‌ها باشد که جنین را نسبت به آنزیم‌ها برای انجام تخم‌گذاری مقاوم تر و امتناع گر می‌سازد و از سوی دیگر، ترشح آنزیم از سلولهای تخم‌گذاری جنین در این مرحله احتمالا در داخل جنین مهار می‌شود و روند تخم‌گذاری با کمک آنزیم‌ها با موفقیت همراه نمی‌گردد (Hall and Sobsey, 1981; Arimoto et al., 1996; Grotmol et al., 2003).

علاوه بر عوامل تاخیر و سرکوب فرآیند تخم‌گذاری که به آن اشاره شد، وجود عوامل محیطی تسریع کننده رشد (مثلا کاهش زمان اولین لارو به دنیا آمده) در جنین آبزیان نیز می‌تواند باعث کاهش موفقیت هیچ و نیز ماندگاری لاروها در هنگام به دنیا آمدن و بعد از به دنیا آمدن لاروها گردد. برای نمونه در آزمایش انجام شده بر روی کفشک آلاسکا *Lepidopsetta polyxystra* نتایج نشان داد که درجه حرارت بالاتر به عنوان یک عامل شناخته شده در تسریع رشد و زودتر انجام شدن فرآیند هیچ در آبزیان، باعث کوچک ماندن سائز لاروهای به دنیا آمده و کاهش نرخ تفریخ، در عین حال بزرگ تر بودن کیسه زرده لاروهای به دنیا آمده شده است، که افزایش فعالیت زیستی لاروها و جنین در اثر عامل خارجی دما در چنین آزمایشی، همزمان با افزایش سرعت نمو، باعث بروز پدیده‌هایی همچون گرسنگی در لاروهای به دنیا آمده و در نتیجه افزایش نیاز به انرژی و سرانجام تلفات ناشی از آن می‌گردد (Laurel and Blood, 2011).

در تحقیق جاری، طی ساعتهای اولیه هیچ تا ۲۴ ساعت از ۳۶ ساعت کل (با توجه به ثبت گام به گام درصد هیچ - جدول ۱) نرخ هیچ در تیمارهای ازن دهی شده زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر از شاهد عقب مانده است و نوعی مهار اولیه در تخم‌گذاری جنین داخل سیستم رخ داده است، ولی در پایان دوره کامل هیچ ۳۶ ساعته، میزان تفریخ تیمارها در همه تیمارهای آزمایشی از دزهای کم تا شدیدتر از ازن دهی، به همان میزان مشخص از حد اعلام شده توسط تولیدکننده محصول (۸۵٪) رسیده است و اختلاف میان تیمارها با شاهد معنی دار نبوده است. این نتیجه نشان می‌دهد که

از ندهی آب بعد از زمان هیدراتاسیون اولیه باعث کاهش نهایی میزان تفریخ سیستم‌ها و اختلال در گشایش پوسته در مدت نهایت فرآیند انکوباسیون (۳۶ ساعت)، به عنوان یک تاثیر سوء نگشته است ولی اعمال دوزهای ازن در تیمارهای زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر باعث شده کندی نمو و رشد جنین تا ساعت ۲۴ از کل ۳۶ ساعت انکوباسیون مشاهده شود (روند و نرخ هیچ گروه‌های مختلف تیماری در نمودار شکل یک را ملاحظه فرمایید). این نتایج معیاری برای انتخاب دزهای زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر، برای مشاهده نتایج تاثیر زیستی ازن بر میزان هیچ احتمالی در آزمایش بعدی شد. در مطالعه Totland و Grotmol (۲۰۰۰) عنوان شده است تیمارهای تخم‌های چشم‌زده قزل‌آلا که در معرض ازن قرار گرفتند، با پدیده تأخیر در تخم‌گشایی یا عدم تخم‌گشایی و تلفات مواجه می‌شوند. در این مطالعه تخم‌های قزل‌آلا که در دزهای بالاتر دچار تلفات و کاهش هیچ شده بودند، در معرض پایین‌ترین مقدار ازن (۴ میلی‌گرم در لیتر به مدت یک دقیقه)، رخداد تخم‌گشایی اولیه غیرهم‌زمان و با تأخیر را نشان دادند که بعد از ۲ روز روند تخم‌گشایی تجمعی به حالت عادی رسیده است. در تخم‌گشایی آرتمیا در آزمایش جاری نیز در نهایت ۳۶ ساعت، نرخ تجمعی تخم‌گشایی در همه گروه‌های تیماری و شاهد یکسان شد.

با تاثیر مهاری ابتدایی بر تخم‌گشایی سیستم‌ها در دزهای زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر احتمال بروز اثر ازن در نرخ شکوفایی سیستم‌ها قابل مشاهده و ملموس تر در نظر گرفته شد. در آزمایش دوم، سیستم‌های تحت تاثیر تیمارهای ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر ازن با مدت‌های ۳ و ۱/۵ دقیقه و ۴۵ ثانیه، با تیمار ۲/۵ میلی گرم در لیتر

از ن دادن اولیه به سیستم‌های آب‌کشیده، بیشترین میزان درصد تفریخ نسبت به شاهد و میزان تضمین کارخانه بروز نمود. این میزان هیچ نسبت به میزان تضمینی هیچ برای مشتریان توسط تولیدکننده (۸۵٪) و شاهد آزمایش به‌طور معنی‌داری بیش‌تر شده است. میزان هیچ در زمان ازن دهی با یک و نیم دقیقه، بعد از تیمار ۴۵ ثانیه‌ای، نیز از شاهد بیشتر بوده است ولی این اختلاف با شاهد و نیز میزان تضمین کارخانه معنی دار نبوده است.

طبق نظر محققین شکستن دیابوز فرآیندی مکانیکی است تا یک فرایند فیزیولوژیک، و تاثیر نخست عوامل شکستن دیابوز به صورت فیزیکی است، زیرا زمان و تاریخ رخداد دی-هیدراتاسیون سیستم (فصل و تاثیرات آن) بر میزان نرخ تخم‌گشایی و تفریخ سیستم‌ها تاثیری ندارد؛ آب از دست دادن و آبرگیری چند باره برای شکست دیابوز گاهی ضروری است؛ و اینکه مشاهدات، تغییرات فیزیولوژیک شدید در این خصوص را در سیستم‌ها و ناپلئوس‌ها نشان نداده‌اند (Abatzopoulos et al., 2002). بدیهی است برای این رخداد نیاز به وجود عوامل محیطی بسیار مهمی است که به محض شکستن دیابوز، نمو سریع و رفتن به مرحله پس از دیابوز در ظرف ۲۴ ساعت و تولید ناپلئوس و لارو در آرتمیا آغاز شود. عدم تاثیر دزهای فزاینده ازن بر پوسته سیستم‌ها، عدم صدمات مکانیکی بر آن و در نتیجه بر میزان تفریخ به دلیل مقاومت زیاد پوسته‌ها به عوامل خارجی محیطی است.

براساس نظر Benoit و Matlin (۱۹۶۶) تحمل متفاوت تخم‌ها و لاروهای ماهی و آبزیان در تلفات یا زنده ماندن را می‌توان با میزان سرعت واکنش ازن با غشای تخم ماهیان و نه با نفوذ یا عدم نفوذ به سلول‌های

جنینی در معرض ازن مرتبط دانست. در این خصوص McNair Scott و Leshner (۱۹۶۳) نیز معتقدند که ازن در باکتری ها نیز، محتوای خود سلول باکتریایی را به دام نمی اندازد، اما بر روی غشا و دیواره سلولی عمل نموده تا باعث لیز یا تجزیه بافتی آن شود. Asbury و Coler (۱۹۹۰) اعلام کردند که میزان تحمل ازن توسط تخم های ماهی که در معرض ازن قرار می گیرند، کوتاه بوده که این امر عمدتاً بر خواص مرتبط با غشا، از جمله وجود یا عدم وجود ماتریس ژلاتینی خارجی است (بسته به گونه) که در مقابل آن مقاومت می کند و ویژگی های جنین درون آن در این تاثیر نقش چندانی ندارد. با توجه به این نظریات، باید گفت که مقاومت سیستم های سخت و غیر قابل نفوذ آرتمیا و عدم تاثیر ازن بر زنده مانی آنها در تحقیق ارایه شده در نتیجه وجود لایه خارجی مقاوم در سیستم است. تفاوت در تحمل و پاسخ به تیمارها در آزمایشها ممکن است ژنتیکی (خصوصیت نژاد) یا به دلیل ماهیت فاکتورهای زیست محیطی باشد. بررسی های بیش تر در مورد ساختار سیستم در تمام گونه های آرتمیا بیان گر این واقعیت است که اگرچه ساختار سیستم در تمام گونه های آرتمیا یکسان است، ولی این سیستم ها در جزئیات دارای اختلافاتی هستند که از آن جمله می توان به تفاوت ضخامت لایه کوریون در آن ها اشاره کرد. نوع و درصد ماده به کار رفته برای رفع کوریون سیستم ها در پوسته زدایی برای افزایش و کاهش مدت هچ، می تواند باتوجه به ضخامت کوریون سیستم نیز متفاوت باشد و حتی استفاده از غلظت استاندارد توصیه شده در سیستم هایی که دارای ضخامت کم تر هستند، گاهی می تواند باعث صدمه به جنین و در نهایت افت درصد تفریخ شود. برعکس درمورد سیستم هایی با ضخامت

بالای کوریون، ممکن است همان دوز بی تاثیر بوده و منجر به کاهش درصد تفریخ نیز شود (Mat Taib et al., 2020; Treece 2000).

با وجود آنچه در فوق به آن اشاره شد برخی از محققان معتقدند که در پدیده ی شکستن خواب و دیابوز، خروج جنین از پوسته تخم و نیز پدیده تاثیر کشنده ازن بر باکتری ها با تاثیر مکانیکی بر لایه خارجی و میزان دز و مدت آن ایجاد می گردد. در حالیکه آزمایش جاری نتایج نشان داد که با وجود اعمال دز بالای ۵۰ میلی گرم بر سیستم های خشک، و عدم تغییر میزان تفریخ در همه ی گروه های تیماری در پایان دوره هچ تاثیر مکانیکی مانند شکستن لایه خارجی و منجر به تلفات از سوی ازن مشاهده نشده ولی از سوی دیگر تاثیر ازن با دز پایین بر جنین موجب کاهش نمو در ساعات اولیه هچ در آزمایش اول شده است. از آنجاکه فرایند شروع هچ با در معرض آب قرار گرفتن سیستم ها (فشار اسمزی) و با میزان اکسیژن مناسب محلول در آب اتفاق می افتد، می توان عوامل موثر بر ترکیبات و نیز میزان اکسیژن محلول را در انگیزش سلولها به نمو زودتر علاوه بر آنچه به صورت مکانیکی برگشایش پوسته سیستم ها کارگر باشد، محتمل دانست. شدت کم ازن به عنوان یک مولکول مهاجم و فعال برخلاف آنچه ازن با شدت زیاد بر روی سلولها ایجاد می کند ماهیتی غیر کشنده دارد که در مقدمه به کاربردهای درمانی دوزهای محدود و کنترل شده اشاره شد.

خروج از حالت های خواب و دیابوز علاوه بر جانوران، در سلولهای سلسه گیاهان هم از نظر تاثیر بر پوسته یا جنین بذر مورد توجه و تحقیق پژوهشگران بوده است. Sudhakar و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه ای

از ازن برای از بین بردن خواب بذر گیاه گوجه فرنگی استفاده کردند. آنها معتقدند که به طور کلی واکنش O_3 بر روی سطح بذرها از طریق یک نوع تبادل جامد-گازی صورت می گیرد و به دنبال آن انتشار درون ساختار سلولی بذر انجام می شود. در این بین تداخلات احتمالی ROS (Reactive Oxygen Species) و هورمون های گیاهی، ارتباط بین H_2O_2 و ABA (آبسزیک اسید یک هورمون موثر در عدم جوانه زنی) محتمل در نظر گرفته شده است. این فرضیه نشان می دهد که ROS، به عنوان عواملی که در سلولها و بافتهای جانوری نیز عملکردی بسیار فعال دارند، با هورمون ها و به ویژه آبسزیک اسید نقش مهمی را در محو خواب و تکمیل جوانه زنی ایفا می کند. با افزودن و انتشار ازن به بذرها، تجمع ROS سلولی، سطوح هورمونها را به تناسب تغییر داده و می تواند فعالیتهای بعدی سلولها را برانگیخته کند و در نهایت عملکردهای پروتئینی داخل جنین از طریق اکسیداسیون دچار تغییر شوند. در گزارش مربوط به فرآیندهای فیزیولوژیکی تفریخ سیستم مورد می توان به عملکرد آنزیم پروتئیناز سیستمین شبه کتسین اشاره کرد که در داخل زرده تامین کننده پروتئاز، بازدارنده های پروتئاز، و نیز کاپرونها یا chaperones ($p26$, Hsp70) هاست که از انعقاد پروتئین های داخل جنین و مرگ آنها در دیابوز جلوگیری می کنند. در سلولهای قرار گرفته در تنش محیطی، Hsp70 و $p26$ به سمت هسته جنین حرکت کرده و ماتریکس پروتئینی را تثبیت و از جمود سریع (vitrification) جنین هایی که به مرحله سیستم یافته، جلوگیری می کنند. در این فرآیند، قندهای تریه هالوز (trehalose) که برای محافظت از سلولها در سطح سلول موجودند، در هنگام روندهای نامطلوب

فیزیکی محیط مثل یخبندان و یا خشکی، سلولها را از تخریب ناشی از خشکی یا دی هیدراسیون دور نگه می دارند (Clegg and Trotman, 2002) و عملکرد عوامل محیطی که تغییرات داخل سلولی جنین مرتبط با آنزیمهای عملکردی مربوط به نمو و شکستن پوسته را موجب کردند قطعا در نتیجه انکوباسیون نقش خواهند داشت.

در نمونه ای از تاثیر این عوامل محیطی، معلوم شده است که حساسیت به نور در سیستمها و واکنش به آن در تفریخ می تواند به تراکم رنگدانه های موجود در پوسته سیستم مربوط باشد. قرارگیری سیستم در معرض نور و محیط مرطوب منجر به اکسیداسیون یا سفید شدن رنگدانه همتین (نفوذ همتین به درون پوست سیستم) می گردد و باعث نفوذ بیشتر نور در طول زمان به داخل سیستم می شود که از عوامل مهم برای شروع هیچ و تحریک به هیچ می باشد. معلوم شده است که پس از جذب نور توسط همتین، تحریک به هیچ با تنفس و متابولیسم کربوهیدرات ها در سیستم شروع می شود؛ آنزیم های تریه هالوز فعال شده و پس از تجزیه تریه هالوز به گلیکوژن و گلیسرول، تخم گشایی سیستم اتفاق می افتد (Van der Linden et al., 1991). به همین علت برای هیچ سیستم آرمیا استفاده از نور فلورسنت دارنده اشعه ماورا بنفش کم و مناسب برای تحریک زیستی، توصیه شده است. در تحقیق جاری احتمالا استفاده از ازن به صورت محدود به عنوان یک مولکول فعال اکسیدگر، در مسیر منتهی به برانگیختن جنین سیستمهای هیدراته شده از طریق لایه خارجی حساس به موقعیتهای محیطی مانند اکسیژن و نور و تسهیل عبور آن با توجه به میل زیاد به شکستن در سیستمها در محیط مناسب، موثر بوده است. در گزارش Cardile و

منابع

۱. آق، ن.، ۱۳۷۵، *Artemia urmiana*، سیکل زندگی و ارزش غذایی. انتشارات مؤسسه تحقیقات و آموزشی شیلات ایران، ۹۳ ص.
 ۲. آق، ن.، ۱۳۸۱، بررسی بیولوژیکی و اکولوژیکی آرتیمیای دریاچه ارومیه. گزارش نهایی طرح مصوب پژوهش، مرکز تحقیقات آرتیمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه. ۱۵۱ ص.
 ۳. پیرعلی خیرآبادی، ا.، منصوری، ع.، ۱۳۹۵. تأثیر سولفات سدیم، هیدراکسید آلومینیوم و استات آلومینیوم بر پوسته‌زدایی سیست آرتیمیا (*Artemia franciscana*). مجله علمی شیلات ایران، (۳) ۲۵، ۸۰-۷۳.
 ۴. دادگر، ش.، حافظیه م.، ۱۳۹۳. تأثیر نوع غنی ساز و مدت زمان آن بر محتوای غذایی ناپلیوس آرتیمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*). نشریه توسعه آبزی پروری، (۴) ۳۷، ۸-۲۳.
 ۵. زاهدی، م.ر.، بحری، ا.ه.، یحیوی، م.، فلورا محمدی‌زاده، ف.، یاسمی، م.، ۱۳۹۵. اثر غنی سازی آرتیمیای فرانسیسکانا با اسیدهای چرب بلند زنجیره و ویتامین E بر میزان رشد، بازماندگی و مقاومت در برابر استرس‌های دما و شوری در لارو ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*). نشریه توسعه آبزی پروری. (۴) ۶۱، ۱۰-۵۱.
 ۶. فلاحتکار، ب.، رضایی، ف.، جهان بین درگاه، ص.، ۱۳۹۰. تعیین مناسب‌ترین دوز و زمان کپسول‌زدایی سیست آرتیمیای دریاچه مهارلو (*Artemia parthenogenetica*) با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم. مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر. (۱) ۵، ۳۹-۴۷.
- همکاران (۱۹۹۵) ازن در دزهای غیرکشنده برای سلولها در شرایط آزمایشگاهی بر سلولهای پوستی انسان تاثیر تحریکی داشته واکنش‌های ضد ملانوما ایجاد می کند که می تواند نشان از تحریک ازن برای تغییرات ناشی از ملاتونین و سایر رنگدانه ها در سلولها و پوسته جنین در حالت خواب باشد که در شکوفایی سیستمها و نرخ هج موثر هستند.
- ارتباط مولکولهای ازن با روند تاثیر بیشتر عوامل محیطی مانند نور و یا اکسیژن محلول که پیشتر آثار تحریک کنندگی آن بر روی فرایند شروع و بهبود هج مشخص شده است، می تواند در تحقیقات بعدی مورد نظر قرار گیرد.
- در پژوهش انجام شده معلوم شد در صورت بیم داشتن از آلودگی سیستمها و آلوده شدن نوزادگاههای ماهی با سیستمهای هج شده می توان بدون مشکل با غلظت مناسب کشنده میکروارگانیسرها از ازن در حالت خشک استفاده نمود، و در روند هج نیز با بکار گیری ازن، کاهش راندمان تفریخ بروز نمی نماید. از سوی دیگر با توجه به نتایج این تحقیق، با به کار بردن دز پایین ازن (۲/۵ میلی گرم در لیتر ازن) و با فرض ایجاد تحریک در سیستمهای آبگیری شده، میزان تفریخ از میزان شاهد نیز بالاتر می رود.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

- arthropod *Artemia franciscana*. BMC Genomics, 10, 52, 1-9.
18. Clegg, J.S., Trotman, C., 2002. Physiological and biochemical aspects of *Artemia* ecology. In *Artemia Basic and Applied Biology*, eds T.J. Abatzopoulos, J.A. Beardmore, J.S. Clegg, and P. Sorgeloos (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), 129–170. P.250.
 19. Conte, F.P., 1984. Structure and function of the crustacean larval salt gland. *International Review of Cytology*, 91, 45–106.
 20. Croghan P.C., 1958a. The survival of *Artemia salina* (L.) in various media. *Journal of experimental biology*, 35, 213–218.
 21. Croghan, P.C., 1958b. The mechanism of osmotic regulation in *Artemia salina* (h.): the physiology of the branchiae. *Journal of experimental biology*, 35, 234–242.
 22. Dumitrascu, M., 2011. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*, 2(4), 119-122.
 23. Dwivedi, S.N., Diwan, A.D., Iftikhar, M.B., 1987. Oxygen uptake in the brine shrimp *Artemia* in relation to salinity. *Indian Journal of Fisheries*, 34, 359–361.
 24. Elvis, A.M., Ekta, J.S., 2011. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Sciences and Biological Medicines*, 2, 66-70.
 25. Gajardo, G.M., Beardmore J.A., 2012. The brine shrimp *Artemia* adapted to critical life conditions. *Frontiers in Physiology*. 3, Article 185, 1-8.
 26. Grotmol, S., Totland, G.K., 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 89-96.
 27. Grotmol, S., Dahi-Paulsen, E., Totland, G.K., 2003. Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture*, 221, 245-254.
 28. Hall, R.M., Sobsey, M.D., 1993. Inactivation of Hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxide in ۷. موسوی ندوشن، ر.، فرحناک، س.، ۱۳۹۵. تأثیر هیدروژن پراکسید بر پایه نقره بر کپسول‌زدایی و تخم‌گذاری سیست (*Artemia urmiana*). *مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی*، (۲) ۱۱، ۴۰–۳۴.
 8. Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos P., 2002. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Springer. 2-end Edition, P. 428.
 9. Agh, N., Sorgeloos, P., 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. *Artemia & Aquatic Animals Research Center*, 60 p.
 10. Anderson E, Lochhead J.H., Lochhead M.S., Huebner E.; 1970. The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. *Journal of Ultrastructure Research*, 32(5–6), 497-525.
 11. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G., Furusawa I., 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143, Issue 1, 15-22.
 12. Asbury, C., Coler, R., 1990. Toxicity of Dissolved ozone to fish eggs and larvae. *Water Environment Federation*, 52(7). 1990-1997.
 13. Benoit, R.F., Matlin, N.A., 1966. Control of saprolegniasis on eggs of rainbow trout (*Salmo gairdineri*) with ozone. *Transaction of the American Fisheries Society*, 95: 403-412.
 14. Bruice, P.Y., 2001. *Organic Chemistry: Study Guide & Solutions Manual*. Pearson College Div; 2nd edition. 760 p.
 15. Camara, M.R., 2020. After the gold rush: A review of *Artemia* cyst production in northeastern Brazil. *Aquaculture Reports*, 17 (2020) 100359, 1-8.
 16. Cardile, V., Jiang, X., Russo, A., Casella, F., Renis, M., Bindoni, M., 1995. Effects of ozone on some biological activities of cells in vitro. *Cell Biololgy Toxicology*, 11, 11–21.
 17. Chen, W.H., Ge, X., Wang, W., Yu, J., Hu, S., 2009. A gene catalogue for post-diapause development of an anhydrobiotic

- Proceeding of Royal Society, B 276, 3561–3569.
38. Saekil Yun, S., Yoon, S.Y., Sib, E.J., Giri Sang, S., Sang, G.K., Who K.S., et al. 2020. Effect of plasma-activated water, used as a disinfectant, on the hatch rate of dormant cysts of the *Artemia salina*. *Aquaculture* 523 (30), 735232.
 39. Saygi, Y.B., 2003. Effects of hydrogen peroxide, cold storage and decapsulation on the hatching success of *Artemia* cysts. *Journal of Aquaculture- bamidgeh*, 55(2), 107-113.
 40. Sorgeloos, P., 1980. Life history of the brine shrimp, *Artemia*. In: *The brine shrimp Artemia., Ecology, Culturing, Use in aquaculture*. Universa Press., Wettern, Belgium, 456 p.
 41. Sudhakar, N., Nagendra-Prasad, D., Mohan, N., Hill B., Gunasekaran, M., Murugesan, K., 2011. Assessing Influence of Ozone in Tomato Seed Dormancy Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*.2, 443-448.
 42. Thanomsab, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., 2002. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48(4), 193-199.
 43. Treece, G.D., 2000. *Artemia* production for marine larval fish culture. SARPUB. No. 702. P. 58.
 44. Van der Linden A. Gadeyne J. Van Onckelen H. Van Laere A. Declair, W. 1991. Involvement of cyclic nucleotides in light induced resumption of development of *Artemia* embryos. *Journal of Experimental Zoology*. 258(3): 312-321.
 45. Wen, G., Liang, ZH., Xu, Xi., Cao, R., Wan, Q., Ji, G., et al., 2020. Inactivation of fungal spores in water using ozone: Kinetics, influencing factors and mechanisms. *Water Research*. 185, 116218.
 - bufferd water. *Water Scientific Technology*, 27, 371-378.
 29. Hazael, R., Matsuda, S., Mori, Y., Fitzmaurice, B.C., Appleby-Thomas, G., Painter, J.D., 2019. Pressure tolerance of *Artemia* cysts compressed in water medium. *High Pressure Research* (in: 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018)), 39, Issue 2.
 30. Komanapalli, I.R., Mudd, J.B., Lau, H.S., 1997. The effects of ozone on the metabolic activities of *Escherichia coli* K-12. *Toxicology Letters*, 90, 61-66.
 31. Laue, B.J.; Blood, D.M., 2011. The effects of temperature on hatching and survival of northern rock sole larvae (*Lepidopsetta polyxystra*). *Aqua Docs*. 109, 282–291.
 32. Lavens, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P., 1986. International study on *Artemia*. XLI. Influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of *Artemia* cysts produced in a standard culture system. *Marine Ecology Progress Series*, 31, 197-203.
 33. Mat Taib, M., Irvani, M., Sorgeloos, P., Danish-Daniel, M., Pau Tan, M., Wong, L.L., 2020. Cyst viability and stress tolerance upon heat shock prote in 70 knockdowns in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Cell Stress and Chaperones*. 25, 1099–1103.
 34. McNair Scott, D.B., Leshner, E.C., 1963. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 85(3), 567–576.
 35. Morris, J.E, Afzelius, B.A., 1967. The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia* next term *salina* embryos during cryptobiosis and development. *Journal of Ultrastructure Research*. 20(3–4), 244-259.
 36. Obayes, L.M. , Abd Al-Rezzaq, A.J., Al-Amari, M.J., 2020. The effect of some environmental factors in the hatching of *artemia* cysts isolated from three Babylon Province's ponds, *Ann Trop Med & Public Health*; 23(S19), SP232114.
 37. Penfield, S., King, J., 2005. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination.